

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

УДК 595.753+575.22

**ВОРОБЬЕВА
МАРИЯ МИХАЙЛОВНА**

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ
И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ВИДОВ ТЛЕЙ
(STERNORRHYNCHA: ARHIDOIDEA), ОТНОСЯЩИХСЯ
К РАЗНЫМ ЭКОЛОГО-СИСТЕМАТИЧЕСКИМ ГРУППАМ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальностям 03.02.05 – энтомология
03.01.07 – молекулярная генетика

Минск, 2018

Работа выполнена на базе кафедры зоологии биологического факультета
Белорусского государственного университета

Научный руководитель – **Воронова Нина Владимировна**,
кандидат биологических наук, доцент,
доцент кафедры зоологии
биологического факультета
Белорусского государственного университета.

Официальные оппоненты: **Трепашко Людмила Ивановна**,
доктор биологических наук, профессор,
заведующая лабораторией энтомологии
РУП «Институт защиты растений»;

Баранов Олег Юрьевич,
кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник
лаборатории генетики и биотехнологий
ГНУ «Институт леса НАН Беларуси».

Оппонирующая организация – Государственное научно-производственное
объединение «Научно-практический центр
Национальной академии наук Беларуси
по биоресурсам»

Защита состоится 27 февраля 2018 г. в 14.00 на заседании совета по защите
диссертаций Д 02.01.22 при Белорусском государственном университете
по адресу: 220030, г. Минск, ул. Ленинградская, 8, юридический факультет,
ауд. 407.

Телефон ученого секретаря: +375(17) 209-55-58; e-mail: nlysukha@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Белорусского
государственного университета.

Автореферат разослан «23» января 2018 г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций,
кандидат технических наук

Н.А. Лысухо

ВВЕДЕНИЕ

Настоящие тли (Aphidoidea) – группа гемиптероидных насекомых (Insecta: Hemipteroidea), успешно освоивших в качестве кормовых объектов растения практически всех таксонов. В мировой фауне насчитывается более 5000 рецентных видов тлей (Footit [et al.], 2008), многие из которых принадлежат к числу вредителей культивируемых и иных хозяйственно ценных растений. Способность к партеногенетическому размножению позволяет тлям быстро наращивать численность популяций, а наличие крылатых морф и облигатность миграций у двудомных видов способствует эффективному расселению, что обеспечивает высокий адаптивный потенциал этих фитофагов. Помимо потери пластических веществ питание тлей может сопровождаться нарушением обмена у повреждаемых растений, проявлениями теротегенеза, распространением вирусов и других возбудителей заболеваний растений (Ferreres, Moreno, 2009).

В последнее время отмечается расширение ареалов многих видов тлей, в частности, проникновение новых видов на территорию Беларуси (Жоров, 2017), других стран Европы (Rakauskas, 2011) и регионов мира. Зачастую адаптации к новым природно-климатическим условиям являются результатом длительных процессов и сопровождаются значительными биологическими и экологическими модификациями, в частности, изменением биологического цикла и расширением спектра кормовых растений. Поскольку растение является единственным источником пищи этих фитофагов, адаптация тлей к новым кормовым ресурсам в условиях «новых» частей ареалов способна приводить к экологической изоляции адаптированных с этими растениями форм, и, соответственно, может вести к возникновению генетической изоляции между популяциями и, как результат, появлению криптических подвидов или даже видов, трудно дифференцируемых по морфологическим признакам (Margaritopoulos [et al.], 2000; Frantz [et al.], 2006; Pessoud, 2010).

Различного рода адаптации к изменениям условий среды свидетельствуют о высоком уровне экологической пластичности тлей, которая генетически детерминирована и поддерживается естественным отбором (Beutel [et al.], 2013). Как известно, внутривидовая морфологическая пластичность и генетическая вариабельность, также как и экологическая пластичность, являются ключевыми факторами, обеспечивающими выживание популяций в динамичных условиях окружающей среды и способствующими противостоянию давлению естественного отбора (Вилкова [и др.] 2001; Vilcinskas, 2016). Изучение уровня морфометрической изменчивости и генетической вариабельности у тлей, принадлежащих к разным эколого-систематическим группам, а также корректное установление таксономического статуса «проблемных форм» с использованием современных морфометрических и молекулярно-генетических методов имеет важное научно-теоретическое и практическое значение для понимания механизмов, обеспечивающих высокую экологическую пластичность насекомых этого таксона. Такого рода данные крайне важны для составления прогнозов биологических инвазий, оценки стабильности популяций вредителей и переносчиков заболеваний растений.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами), темами.

Диссертационная работа выполнена на базе кафедры зоологии биологического факультета Белорусского государственного университета в период 2014–2017 гг. в соответствии с общими направлениями исследований в рамках следующих научно-исследовательских работ: «Анализ современных трендов динамики беспозвоночных-фитофагов с целью прогноза инвазий на территорию Республики Беларусь и ее регионов вредителей культивируемых и ресурсных видов растений» (2011–2015 гг., ГПНИ «Природно-ресурсный потенциал», № ГР 20115603); «Разработка предиктивной технологии выявления клонов тлей, устойчивых к фитотоксинам инсектицидного действия, на основе анализа последовательности генов СУР450» (2014–2015 гг., ГПНИ «Фундаментальные основы биотехнологий», № ГР 20141131); «Структура генов СУР450 4 и 6 семейств и их продуктов у тлей: динамика микроэволюционных изменений» (2016–2018 гг., ГПНИ «Биологические системы и технологии», № ГР 20161711); «Изучение особенностей формирования устойчивости к пиримифосметилу и имидаклоприду в линиях тлей, ассоциированных с конкретными кормовыми растениями» (2016 г., грант для аспирантов и студентов БГУ); «Изучение морфологической и генетической изменчивости инвазивных видов тлей на новой территории (на примере *Brachycaudus divaricatae* Shar., 1956, коллектированных на территории Беларуси)» (2017 г., грант Министерства образования Республики Беларусь, № ГР 20170659); «Оценка применимости метода ПЦР-ПДРФ анализа для выявления гаплотипов среди многоядных видов тлей родов *Aphis* и *Myzus*» (2017 г., грант для аспирантов и студентов БГУ); «Вариабельность нуклеотидных последовательностей маркерных областей митохондриальной ДНК у насекомых с разными вариантами типов размножения и биоэкологических адаптаций» (2017–2019 гг., проект БРФФИ Б17МС–025, № ГР 20171118).

Тематика работы соответствует Перечню «Приоритетных направлений научных исследований Республики Беларусь на 2016–2020 гг.» (Постановление Совета Министров Республики Беларусь № 190 от 12.03.2015 г.), в частности, пунктам 3. «Биологические системы и технологии» и 10. «Экология и природопользование».

Цель и задачи исследования. Цель диссертационного исследования – оценка уровня морфологической и генетической изменчивости настоящих тлей (Aphidoidea) как таксона, включающего виды, различающиеся между собой особенностями биологии и экологии и разработка ПЦР-ПДРФ ключей для диагностики ряда видов тлей – вредителей сельскохозяйственных и декоративных культур.

Для ее достижения представлялось необходимым:

1) оценить уровень изменчивости морфометрических признаков инвазивных видов Aphidoidea на примере алычово-дремовой тли (*Brachycaudus divaricatae* Shar.) на

территории Беларуси, отличающейся климатическими условиями от условий их первичного ареала;

2) оценить уровень изменчивости микросателлитных локусов у инвазивных популяций тлей *B. divaricatae* в сравнении с неинвазивными видами *Macrosiphum rosae* (L.) и *Macrosiphum knautiae* Holm.;

3) оценить уровень полиморфизма последовательностей митохондриальных генов у тлей из разных систематических групп;

4) установить наличие и характер влияния широты ареала, степени пищевой специализации и варианта биологического цикла на изменчивость последовательностей митохондриальных генов;

5) установить количество и оценить уровень варибельности генов CYP450 4-го и 6-го семейств у тлей, различающихся широтой спектра кормовых растений;

6) получить ДНК-штрихкоды и разработать ПЦР-ПДРФ ключи для идентификации трудно дифференцируемых по морфометрическим признакам тлей фауны Беларуси – вредителей сельскохозяйственных и декоративных культур.

Научная новизна. Получены оригинальные данные, характеризующие уровень морфометрической гетерогенности инвазивного на территории Беларуси вида тлей *Brachycaudus divaricatae* Shar. Проведен сравнительный анализ морфометрической изменчивости и генетической варибельности инвазивных и неинвазивных видов тлей (на основе выборок бескрылых партеногенетических самок, коллектированных из первичного и вторичного ареалов). Впервые депонированы в «Республиканский Банк ДНК человека, животных, растений и микроорганизмов» государственного научного учреждения «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси» 26 образцов биологического материала и 26 образцов ДНК тлей – вредителей сельскохозяйственных и декоративных культур. Расшифрованы и депонированы в GenBank нуклеотидные последовательности генов COI и EF-1 α для 18 видов тлей рецентной фауны Беларуси, среди которых для 15 видов тлей нуклеотидные последовательности были получены впервые. Впервые установлено количество и изучен уровень варибельности адаптивно значимых генов (CYP450 4-го и 6-го семейства) у тлей *Aphis fabae mordvilkoï* Böm. & Janisch. Впервые разработаны ПЦР-ПДРФ ключи, позволяющие проводить корректную диагностику трудно дифференцируемых по морфологическим признакам видов тлей рода *Dysaphis* Böm., подвидов *Aphis fabae* Scop. и *Myzus cerasi* F., а также выявлять конкретные гаплотипы COI у некоторых многоядных видов тлей.

Положения, выносимые на защиту:

1) У алычово-дремовой тли (*Brachycaudus divaricatae* Shar.), являющейся в Беларуси типичным инвайдером, не отмечается особенностей в уровне внутривидовой морфометрической и генетической варибельности в сравнении с выборками из первичного ареала вида. Генетическая структура популяции *B. divaricatae* в Беларуси

указывает на неоднократное проникновение этих тлей на территорию страны, что объясняет отсутствие проявления «эффекта основателя» и привело к сохранению пула типичной для вида изменчивости.

2) Тли, относящиеся к разным семействам, в целом характеризуются различным уровнем внутривидовой варибельности консервативных митохондриальных генов. При этом полифаги с субкосмополитным распространением, являющиеся анологическими на большей части ареала, демонстрируют наибольший уровень внутривидового полиморфизма в сравнении с тлями других биоэкологических (голоциклические олигофаги и монофаги с разной шириной ареалов) групп. Наличие у вида анологических линий вносит наибольший вклад в уровень внутривидового полиморфизма митохондриальных генов.

3) В геноме полифага (генералист с широким спектром кормовых растений) *Aphis fabae mordvilko* Börn. & Janisch обнаружен 31 ген CYP4 и 19 генов CYP6, отвечающих за метаболизм ксенобиотиков у насекомых. Количество генов CYP450 4-го и 6-го семейства у *A. fabae mordvilko* не превышает количество копий этих генов в геномах тлей, относящихся к числу олигофагов. Отсутствие прямой связи между количеством генов CYP4 и CYP6 и шириной спектра кормовых растений указывает на сложный механизм формирования полифагии у тлей.

4) Уровень варибельности последовательности гена субъединицы 1 цитохром-с-оксидазы (COI) у тлей достаточен для разработки ПЦР-ПДРФ ключей, предназначенных для идентификации таксонов низкого ранга. Идентификационные ПЦР-ПДРФ ключи, разработанные на основе последовательности COI, позволяют проводить определение ряда трудно дифференцируемых видов и подвидов тлей фауны Беларуси, а также выявление носителей конкретных гаплотипов COI.

Личный вклад соискателя ученой степени. В основу работы положены собственные сборы тлей фауны Беларуси, а также сборы, любезно предоставленные автору для исследований доктором биологических наук, профессором С.В. Бугой, кандидатами биологических наук А.В. Стекольниковым, Д.Г. Жоровым, Г.А. Карагян, А.Э. Айвазян, младшим научным сотрудником О.В. Синчуком и аспирантом А.С. Рогинским, которым мы выражаем свою искреннюю признательность. Автором проведена обработка энтомологического материала, изготовление морфологических препаратов, съемка морфометрических промеров, выделение ДНК из биологического материала, получение ПЦР-продуктов, депонирование в GenBank нуклеотидных последовательностей генов COI и EF-1 α , филогенетический анализ, рестрикционный анализ, создание ПЦР-ПДРФ ключей, статистическая обработка и анализ полученных результатов, а также интерпретация и их изложение.

Тема, цель и задачи исследования сформулированы совместно с научным руководителем. Подготовка рукописи кандидатской диссертации выполнена автором лично при консультации научного руководителя.

Апробация результатов диссертации. Результаты диссертационного исследования представлены на 7 международных и региональных научных и научно-практических конференциях: «Зоологические чтения – 2015» (Гродно, 2015 г.); «Ломоносов – 2015» (Москва, 2015 г.), «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» (Минск, 2015 г.), «Современные проблемы энтомологии Восточной Европы» (Минск, 2015 г.), «Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов» (Минск, 2015 г.), «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» (Минск, 2016 г.), «Итоги и перспективы развития энтомологии в Восточной Европе» (Минск, 2017 г.), «Актуальные проблемы зоологической науки в Беларуси» (Минск, 2017 г.).

Опубликованность результатов диссертации. По теме диссертационного исследования опубликовано 37 печатных работ, в том числе: 8 статей, соответствующих п. 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, объемом 3,5 авторских листа, 6 – в сборниках научных трудов, 15 – в сборниках материалов научных конференций, 6 – в сборниках тезисов докладов, а также 2 учебно-методических пособия. Общий объем опубликованных материалов составляет 9,6 авторских листа.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из перечня сокращений и условных обозначений, введения, общей характеристики работы, основной части из 5 глав, заключения, библиографического списка и приложений. Общий объем диссертации составляет 205 страниц, включает 16 таблиц (23 страницы), 41 иллюстрация (38 страниц), библиографический список из 190 наименований (15 страниц), 8 приложений (67 страниц).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Особенности биологии, экологии и эволюции тлей: состояние изучения вопроса и перспективы использования молекулярно-генетических методов (обзор литературных источников)

В главе рассмотрены проблемные вопросы систематики тлей, а также особенности их морфологии (изменчивость морфометрических признаков), биологии (модификации биологических циклов) и экологии (приуроченность к кормовым растениям и широта ареалов). Особое внимание уделено изучению внутривидового полиморфизма у тлей, – как морфологического, так и генетического, а также использованию методов ДНК-штрихкодирования и ПЦР-ПДРФ анализа для корректной диагностики трудно дифференцируемых видов и подвидов насекомых.

На основе анализа литературных источников констатировано, что внутривидовая морфологическая пластичность и генетическая вариабельность, так же как и способность к модификации биологии и экологии, являются важными факторами, обеспечивающими выживание видов в неблагоприятных условиях окружающей среды и способствующими противостоянию давления естественного отбора на популяционном

уровне, выработке резистентности к инсектицидам и преодолению устойчивости культивируемых растений. В связи с этим изучение уровня морфологической вариабельности и генетической гетерогенности у тлей разных эколого-систематических групп представляет не только интересную исследовательскую задачу, но и имеет прикладное значение.

Материал и методология исследований

В работе использовали афидологический материал, коллектированный в 2010–2016 гг. в Беларуси, Армении и Вьетнаме. Тотальные препараты для микроскопии изготовили в заключающей среде Фора-Берлезе. Морфологическое определение тлей проводили с использованием определительных таблиц, которые разработали Г.Х. Шапошников (Шапошников, 1964) и О.Е. Heie (Heie, 1992).

Съемку абсолютных морфометрических показателей бескрылых партеногенетических самок, таких как длина тела (включая хвостик), длины I–VI члеников усиков и шпика последнего членика усика, общая длина усиков, длина апикального членика рострума (IV членика хоботка), длина II членика задней лапки, длина трубочек, длина хвостика, проводили с использованием микроскопа CarlZeiss Stemi 2000, оснащенного окуляр-микрометром.

Экстракция ДНК выполнялась двумя различными способами с внесением изменений в протоколы производителей (методика была адаптирована для работы с единичными образцами). ПЦР проводили с использованием геноспецифичных и локус-специфичных праймеров (Folmer [et al.], 1994; Dohlen [et al.], 2002; Raboudi [et al.], 2005; K. Aravind [et al.], 2007; Coeur d'Acier [et al.] 2012). Длины амплифицируемых фрагментов определяли по результатам электрофоретического разделения с использованием пакета прикладных программ GelQuest 3.2.1. Секвенирование ПЦР-продуктов выполнялось компанией Macrogen (Нидерланды), Центром ДНК-штрихкодирования Института Биоразнообразия Онтарио при университете Гуэлфа (Канада), а полногеномное секвенирование – в Центре секвенирования ДНК Университета штата Юта (г. Солт-Лейк-Сити, США). Кроме собственных расшифрованных нуклеотидных последовательностей, использовали ортологичные нуклеотидные последовательности генов COI, COII, *cytb*, CYP4 и CYP6, представленные в международных генетических базах данных (NCBI, BOLD и IAGC). Множественное выравнивание последовательностей, расчет парных генетических дистанций, построение дендрограмм осуществляли с использованием программ MEGA7 и BEAST2.4.7. Число (h) и дивергенция (Hd) гаплотипов и нуклеотидное разнообразие (P_i) были рассчитаны в программе DnaSPv.5. Консенсусные последовательности составили в программе WebLogo2.8.2.

При статистическом анализе последовательностей для минимизации влияния состава и размера выборок на получаемый результат с использованием программы SHaRK были созданы искусственные реплики, содержащие заданное число случайно выбранных нуклеотидных последовательностей. Статистическую обработку количественных данных осуществили методами непараметрической статистики (медианный тест Манна–Уитни, метод множественного сравнения средних, тест ранговой корре-

ляции Спирмена) и методом ANOVA (однофакторный и многофакторный дисперсионный анализ). Достоверными было решено считать различия при $p \leq 0,05$.

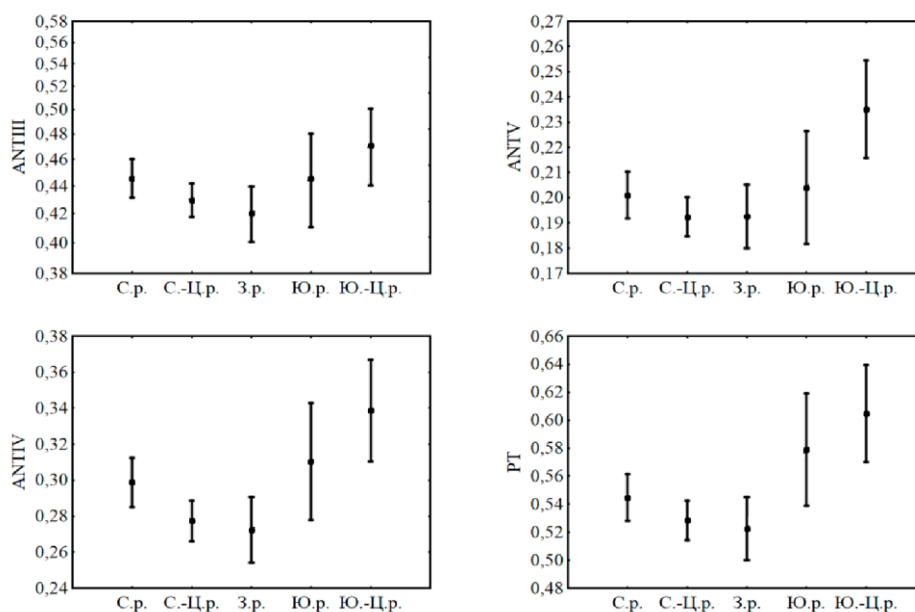
Поиск сайтов рестрикции в нуклеотидных последовательностях гена COI целевых объектов осуществляли в программе BioEdit. Графические рестрикционные карты построили с использованием программ CodonCodeAligner 4.2.7. и pDRAW32 1.1.112.

Внутривидовой полиморфизм у тлей, принадлежащих к разным эколого-систематическим группам

В работе использовали сборы тлей 14 видов, коллектированные в Беларуси, Армении и Вьетнаме в период с 2010 по 2016 гг., а также on-line доступные данные о нуклеотидных последовательностях для тлей этих видов и дополнительно – для 42 видов тлей мировой фауны.

Для оценки уровня морфометрической изменчивости инвазивных видов тлей во вторичном ареале провели сравнительный анализ значений морфометрических параметров и индексов у бескрылых партеногенетических самок *B. divaricatae*, коллектированных на территории Беларуси. По результатам съемки морфометрических данных 173 экземпляров тлей, коллектированных в разных районах интродукции древесных растений, были рассчитаны диапазоны варьирования и средние значения морфометрических параметров, а также рассчитаны морфометрические индексы, используемые для видовой диагностики тлей рода *Brachycaudus* van der Goot (Rakauskas, Turčinavičine, 2006). Для выявления возможных различий значений морфометрических параметров между экземплярами *B. divaricatae*, коллектированными в разных районах интродукции древесных растений Беларуси, провели однофакторный дисперсионный анализ. В результате анализа нами были отмечены статистически значимые различия между бескрылыми партеногенетическими самками *B. divaricatae*, коллектированными в разных районах интродукции древесных растений в Беларуси, в дисперсии длины III членика усика ($F=2,738$; $p=0,00$), длины IV членика усика ($F=5,830$; $p=0,000$), длины V членика усика ($F=4,439$; $p=0,00$) и длины шпика последнего членика усика ($F=5,680$; $p=0,000$). Обращает на себя внимание то, что особи, коллектированные в Южном и Южно-Центральном районах интродукции древесных растений в Беларуси, обладали более длинными усиками в сравнении с образцами, коллектированными в Северном, Северно-Центральном и Западном районах интродукций растений (рисунок 1).

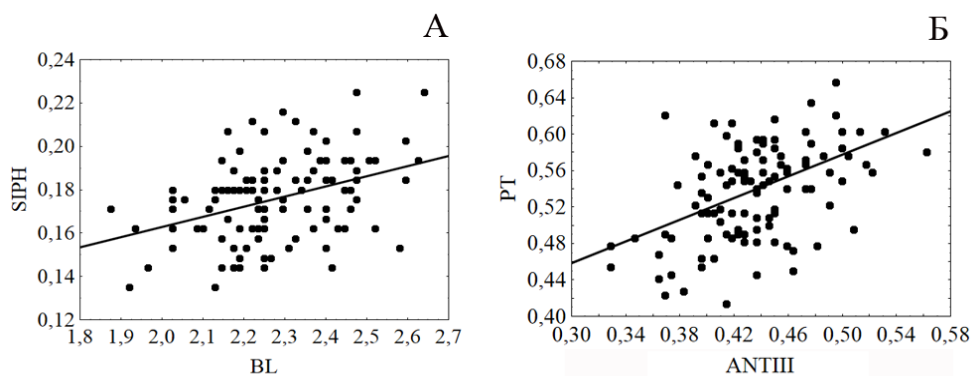
Для оценки уровня сходства/различия особей внутри популяции *B. divaricatae* были рассчитаны диагностические и дополнительные морфометрические индексы. Оказалось, что значения диагностических индексов, представляющих отношение длины трубочек к длине тела, у особей *B. divaricatae*, коллектированных в пяти районах интродукции древесных растений в Беларуси, варьировали в пределах значений, типичных для рода, – от 0,059 до 0,096 мм (со средним значением 0,077 мм), а отношение длины шпика последнего членика к длине III членика усика – от 0,971 до 1,683 мм (со средним значением 1,242 мм).



С.р. – Северный район; С.-Ц.р. – Северо-Центральный район; З.р. – Западный район;
Ю.р. – Южный район; Ю.-Ц.р. – Южно-Центральный район

Рисунок 1. – Сравнительный анализ длин (в мм) III членика усика (ANTIII), IV членика усика (ANTIV), V членика усика (ANTV) и шпика последнего членика усика (PT) бескрылых самок *Brachycaudus divaricatae* Shar., коллектированных в районах интродукций растений в Беларуси

Построение диаграммы разброса индивидуальных значений морфометрических параметров показало, что значения диагностических морфометрических характеристик бескрылых партеногенетических самок *B. divaricatae*, коллектированных в разных районах интродукции древесных растений в Беларуси, образуют единое облако, что соответствует отсутствию выделения каких-либо внутрипопуляционных группировок (рисунок 2). Анализ дополнительных морфометрических индексов также не позволил выявить в анализируемых выборках тлей значительно отличающихся особей.



А) отношение длины трубочек (SIPH) к длине тела (BL);
Б) отношение шпика последнего членика усика (PT) к длине III членика усика (ANTIII)

Рисунок 2. – Диаграммы разброса индивидуальных значений морфометрических параметров бескрылых партеногенетических самок *Brachycaudus divaricatae* Shar.

Поскольку *B. divaricatae* принадлежит к числу инвазивных видов тлей фауны Беларуси, в то время как в Армении данный вид является аборигенным, сравнение локальных популяций из Беларуси и Армении по морфометрическим характеристикам позволит оценить стабильность (или отсутствие стабильности) морфометрических параметров *B. divaricatae*, коллектированных в условиях нашего региона. В результате сравнительного анализа полученных нами значений морфометрических параметров для данного вида тлей из Армении (первичный ареал) и Беларуси (вторичный ареал) оказалось, что между сравниваемыми образцами существуют различия в значении некоторых морфометрических параметров по медиане и интерквартильному размаху. У тлей из Армении более короткими оказались I членик усика, II членик усика и основание VI членика усика в сравнении с тлями из Беларуси в 2016 г. Однако бескрылые партеногенетические самки из Армении имели более длинные членики усиков (в частности, III, IV, V), а также шпиг последнего членика усика по сравнению с образцами, коллектированными в Беларуси в 2011–2012 гг. и 2016 г. Кроме того, наблюдались незначительные отличия в длине некоторых члеников усиков между образцами, коллектированными в 2016 г. и в 2011–2012 гг. В частности, у тлей из сборов 2016 г. более длинными оказались II, IV, V членики усиков, основание VI членика усика и II членика задней лапки, а сборов 2012 г. – I, III членики усиков, шпиг последнего членика усика, IV членика хоботка, длина трубочек и хвостика.

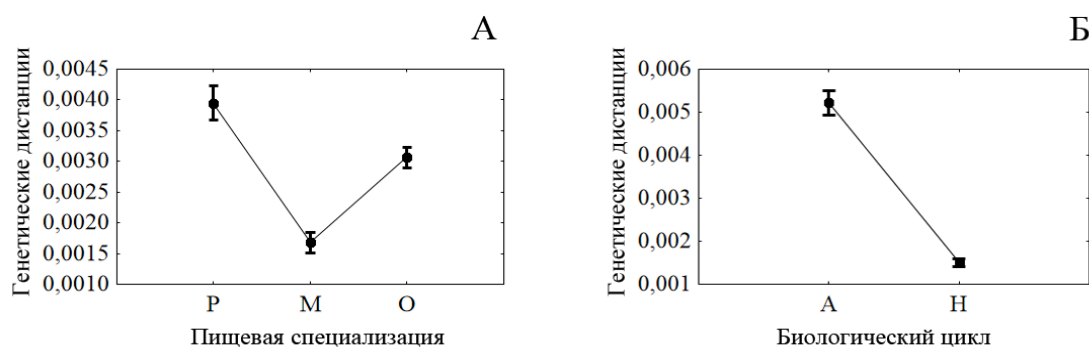
В целом, можно заключить, что в выборках бескрылых партеногенетических самок *B. divaricatae* из Беларуси не было отмечено особей, морфометрические показатели которых отклонялись бы от значений, типичных для этого вида. Сравнительный анализ средних значений морфометрических характеристик и индексов позволил установить, что экземпляры *B. divaricatae*, коллектированные во всех районах интродукции древесных растений в Беларуси, обладают сходным уровнем морфометрической гетерогенности с коллектированными в Армении.

Кроме оценки морфометрической изменчивости, в рамках выполненного исследования ставилась задача сравнения уровня генетической изменчивости инвазивных и аборигенных популяций (на примере *B. divaricatae* из Беларуси и Армении), а также инвазивных (на примере *B. divaricatae*) и неинвазивных (на примере *Macrosiphum rosae* (L.) с использованием в качестве «внешней группы» близкородственного вида *Macrosiphum knautiae* Holm.). Сравнительный анализ *B. divaricatae*, коллектированных в Беларуси и Армении, провели по 11 локусам. Общая выборка составила 104 образца *B. divaricatae*, а именно по 52 образца тлей из Беларуси и Армении для более переменчивых локусов (*Bh-GT3D5*, *Bh-GT3B5*, *Bh-GT3G9*, *Bh-GT3B4*) и по 15 образцов – для менее переменчивых (*Bh-GT3H7*, *Bh-GT3C9*, *Bh-GT3D8*). Существенных генетических различий между сравниваемыми выборками отмечено не было. Сравнительный анализ *B. divaricatae* и *M. rosae*, коллектированных в Беларуси и Армении, и *M. knautiae* из Беларуси провели по 4 локусам, присутствующим в геномах всех трех видов тлей. Общая выборка составила 119 образцов *B. divaricatae* для локусов *Me7*, *Me9* (более ва-

риабельные локусы) и 63 образца – для локусов *Me1*, *Me5* (менее вариабельные локусы); 60 образцов *M. rosae* и *M. knautiae* – для всех анализируемых локусов. Внутрипопуляционные различия у *B. divaricatae* как в Беларуси (где он является чужеродным инвазивным видом), так и в Армении (где он является аборигенным видом) были такими же, как и внутри популяций *M. rosae* из Беларуси и Армении (географически удаленные аборигенные популяции) и *M. knautiae* из Беларуси (аборигенный вид), по одним и тем же локусам.

Исходя из вышесказанного можно заключить, что инвазивные виды тлей, как было показано на примере *B. divaricatae*, осуществившие или осуществляющие активную экспансию на новые территории, сохраняют пул генетической вариабельности, что, возможно, и является залогом успешной адаптации вида к значительно отличающимся природно-климатическим условиям.

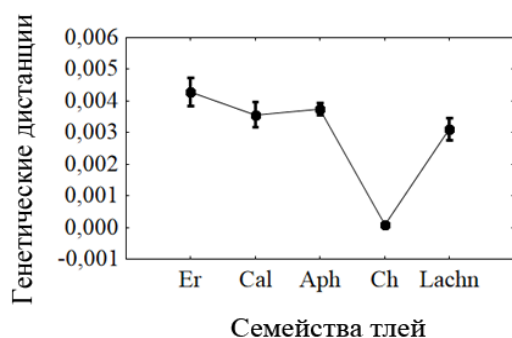
Для изучения внутривидовой генетической вариабельности у тлей из разных систематических групп (Aphididae, Eriosomatidae, Calaphididae, Chaitophoridae и Lachnidae), различающихся между собой шириной ареалов (тли с ограниченным и субкомполитным распространением), спектрами кормовых растений (полифаги, олигофаги и монофаги) и вариантами биологического цикла (голоциклические и анологические), провели сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена COI, COII, *cytb* и рассчитали такие критерии как парные внутривидовые генетические дистанции, число гаплотипов, уровень дивергенции между гаплотипами и уровень нуклеотидного разнообразия. Результаты многофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) позволили констатировать то, что спектр кормовых растений ($p=0,000$; $F=54,423$) и биологический цикл ($p=0,000$; $F=729,90$) вносят существенный вклад в формирование внутривидового полиморфизма у тлей (рисунок 3).



Р – полифаги; М – монофаги; О – олигофаги; А – анологические; Н – голоциклические

Рисунок 3. – Средневзвешенные значения парных внутривидовых генетических дистанций, рассчитанные на основе анализа последовательностей гена COI, у тлей с разным спектром кормовых растений (А) и вариантом биологического цикла (Б)

Уровень внутривидовой генетической вариабельности митохондриальных генов значительно различался в разных семействах тлей ($p=0,000$; $F=206,50$) (рисунок 4).



Er – Eriosomatidae; Cal – Calaphididae; Aph – Aphididae; Ch – Chaitophoridae; Lachn – Lachnidae

Рисунок 4. – Средневзвешенные значения парных внутривидовых генетических дистанций, рассчитанных на основе анализа последовательностей гена COI, для представителей разных семейств тлей

Результаты многофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) показали, что широта ареала ($p=0,000$; $F=21,214$ между космополитными и локально распространенными видами), спектр кормовых растений ($p=0,000$; $F=32,160$ между полифагами, олигофагами и монофагами) и биологический цикл ($p=0,000$; $F=179,77$ между аналоциклическими и голоциклическими) оказывает значительное влияние на формирование внутривидового полиморфизма у тлей Aphididae.

Изменчивость генов, связанных с адаптацией к кормовым растениям, у тлей из разных эколого-систематических групп

Совместно с центром секвенирования ДНК Университета штата Юта было проведено секвенирование генома полифага (генералист с широким спектром кормовых растений) *A. fabae mordvilkoii*. Из прочтений генома были извлечены последовательности генов CYP4 (CYP4C1, CYP4G15, CYP4V2 и CYP4C3) и CYP6 (CYP6B1, CYP6A13, CYP6A14, CYP6J1, CYP6K1 и CYP6A2), которые, как известно [Schuler, 1996; Воронова, 2016], позволяют многоядным видам тлей адаптироваться к питанию на растениях с различным составом вторичных метаболитов.

В результате целевого поиска генов CYP450 у *A. fabae mordvilkoii* выявлен 31 ген CYP4, в то время как у *Acyrtosiphon pisum* Harr. (олигофаг) их количество составило 29 (таблица 1).

Таблица 1. – Количество генов CYP450 4-го и 6-го семейств у тлей-полифагов и олигофагов

Гены	Полифаги		Олигофаги	
	<i>Aphis fabae mordvilkoii</i> Börn. & Janisch	<i>Myzus persicae</i> Sulž.	<i>Acyrtosiphon pisum</i> Harr.	<i>Diuraphis noxia</i> Mordv.
CYP450 4-го семейства				
CYP4C1	24	18	21	13
CYP4G15	2	1	4	3
CYP4V2	4	–	2	3
CYP4C3	1	–	2	–
CYP450 6-го семейства				
CYP6B1	1	–	2	3
CYP6A13	8	7	13	8
CYP6A14	4	4	3	5
CYP6J1	1	1	1	1
CYP6K1	4	5	4	3
CYP6A2	1	1	1	1

Для оценки уровня варибельности последовательностей CYP4 и CYP6 у *A. fabae mordvilkoii* мы создали консенсусные последовательности. Оказалось, что копии генов CYP4C1, CYP6A13 и CYP6A14 у *A. fabae mordvilkoii*, как и у остальных видов тлей, характеризуются высокой варибельностью как нуклеотидных, так и аминокислотных последовательностей (рисунок 5).

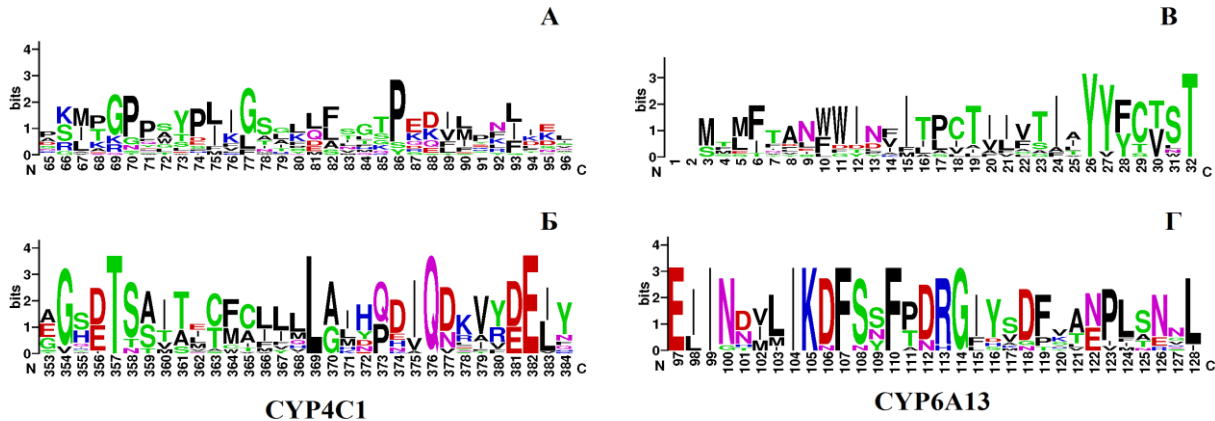


Рисунок 5. – Участки консенсусных последовательностей, отражающие уровень варибельности аминокислотных последовательностей копий CYP4 (А, Б) и CYP6 (В, Г) у тлей *Aphis fabae mordvilkoii*

В последовательностях копий генов CYP4G15, CYP4V2 и CYP6K1 у *A. fabae mordvilkoii* как и у *A. pisum*, *M. persicae* и *D. noxia* были выявлены как сравнительно консервативные, так и варибельные участки.

Для оценки уровня сходства/различия между аминокислотными последовательностями CYP4C1, CYP4G15, CYP4V2, CYP4C3, CYP6B1, CYP6A13, CYP6A14, CYP6J1, CYP6K1 и CYP6A2 были построены дендрограммы (рисунок 6).

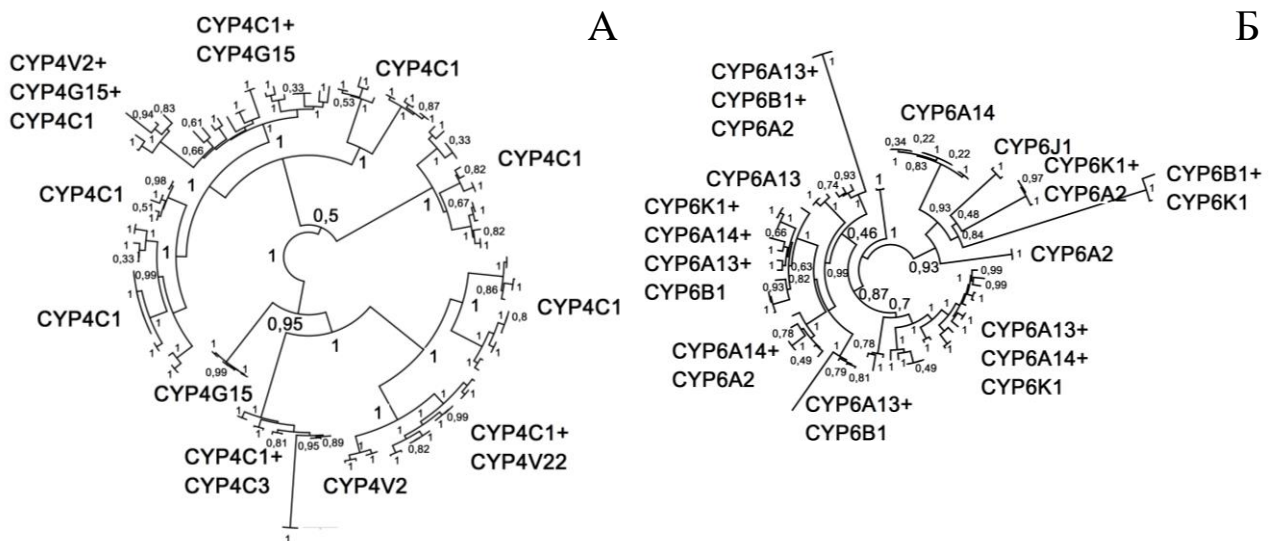


Рисунок 6. – Дендрограмма, отражающая уровень сходства/различия между аминокислотными последовательностями CYP4 (А) и CYP6 (Б) *Aphis fabae mordvilkoii*

Апостериорная вероятность узлов между аминокислотными последовательностями СУР4 (рисунок 6 А) варьирует от 1 до 0,33, а между последовательностями СУР6 (рисунок 6 Б) – от 1 до 0,22. Несмотря на то, что между отдельными кластерами апостериорная вероятность узлов имеет низкое значение, в целом между всеми кластерами отмечено высокое значение апостериорной вероятности узлов, равное или близкое к 1.

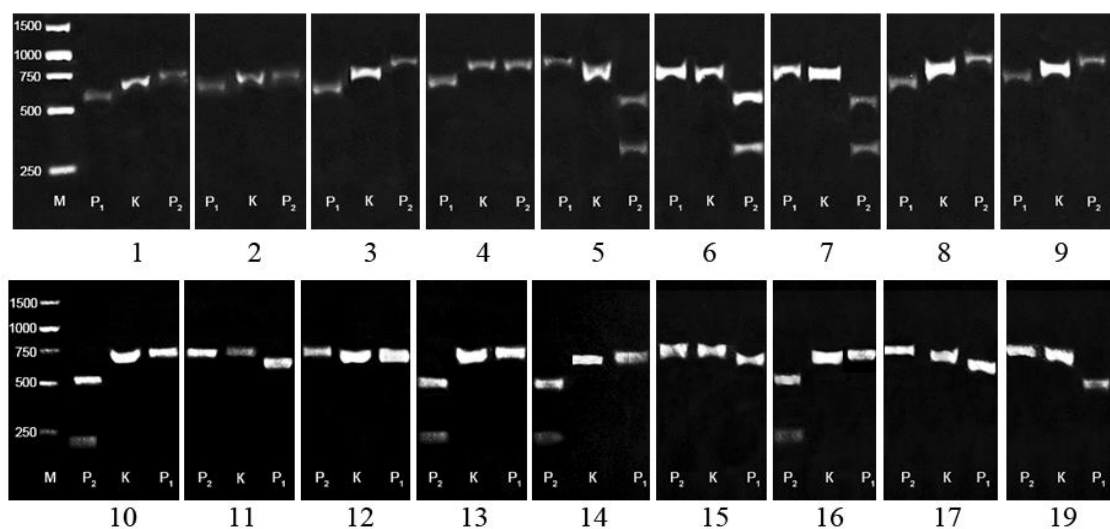
Оценивая деревья в целом, можно заключить, что аминокислотные последовательности СУР4С1, СУР6А13 и СУР6А14 тлей *A. fabae mordvilkoï* характеризуются высоким уровнем полиморфизма в сравнении с остальными анализируемыми генами.

Идентификация отдельных видов тлей с использованием методов ДНК-диагностики

ДНК-штрихкодирование и ПЦР-ПДРФ анализ представляют собой наиболее эффективный способ проведения исследований, связанных с установлением таксономической принадлежности трудно дифференцируемых видов тлей (Hebert [et al.], 2003; Aravind [et al.], 2007). В рамках настоящего исследования были получены ДНК-штрихкоды для 6 видов и подвидов тлей фауны Беларуси, в частности *A. fabae mordvilkoï*, *Aphis pomi* Deg., *Aphis spiraecola* Patch, *Colopha compressa* Koch, *Panaphis juglandis* (Gz.) и *Uroleucon hypochoeridis* (F.). Для одного вида тлей (*C. compressa*) нуклеотидная последовательность гена COI была получена впервые. Кроме того, были расшифрованы нуклеотидные последовательности для тлей *Trichosiphonaphis corticis* (Aiz.), *Aphis euphorbiae* Kalt., *Hyalopterus pruni* (Geoffr.), *Longicaudus trirhodus* (Walk.), *U. hypochoeridis*, *Therioaphis tenera* Aiz., *Monaphis antennata* (Kalt.), *P. juglandis*, *Siphonaphis maydis* Pass., *Periphyllus aceris* (L.), *Drepanosiphum platanoidis* (Schrnk), *Schizolachmus pineti* (F.), *C. compressa*, *Gyphina jacutensis* Mordv. и *Anoecia corni* (F.). Для двенадцати видов тлей нуклеотидные последовательности гена EF-1 α были получены впервые. Расшифрованные нуклеотидные последовательности депонированы в GenBank (NSBI) и могут быть использованы в дальнейшем для идентификации энтомологических образцов методом ДНК-штрихкодирования.

На основе анализа нуклеотидных последовательностей гена COI были построены рестрикционные карты, а также разработаны ПЦР-ПДРФ ключи для диагностики 5 трудно дифференцируемых видов тлей фауны Беларуси (*A. spiraecola*, *A. pomi*, *Dysaphis anthrisci* Böm., *D. radicola* Mordv., *D. plantaginea* Pass., принадлежащих к числу вредителей семечковых культур), подвидов двух видов тлей (*A. fabae* и *Myzus cerasi* (F.) – вредителей сельскохозяйственных культур), а также для выявления внутривидовых гаплотипов COI у трех видов тлей (*Aphis craccivora* Koch, *Aphis gossypii* Glov. и *M. persicae*) с широким спектром кормовых растений. В частности, для корректной видовой диагностики среди трудно дифференцируемых так называемых «зеленых тлей» рода *Aphis* L.: зеленой яблонной тли (*A. pomi*) можно использовать 5 эндонуклеаз (AciI, BamHI, HpyAV, HpyCH4V и NlaIV), а для зеленой цитрусовой (*A. spiraecola*) – 4 (TatI, CviQI, BccI и PfaII). Для установления видовой принадлежности зеленых тлей, коллектированных в условиях Беларуси с одних и тех же кормовых растений, мы

отобрали две эндонуклеазы, среди которых один фермент рестрикции (CviQI) имел сайт узнавания только в последовательностях COI *A. spiraecola*, а второй (BamHI) – в последовательностях COI *A. pomi* (рисунок 7).



М – маркер молекулярного веса; P1 – образцы, обработанные рестриктазой BamHI, P2 – образцы, обработанные рестриктазой CviQI; К – фрагмент, не обработанный рестриктазой; 1 – тли с *Malus* sp.; 2, 4, 6, 8, 13, 17, 19 – тли с *Crataegus* sp.; 3, 5, 10, 12 – тли с *Cotoneaster lucidus*; 7, 14 – тли со *Spiraea* sp., 11, 15 – тли с *Chaenomeles japonica*; 9 – тли с *Pyrus communis*; 16 – тли с *Amelanchier* sp.

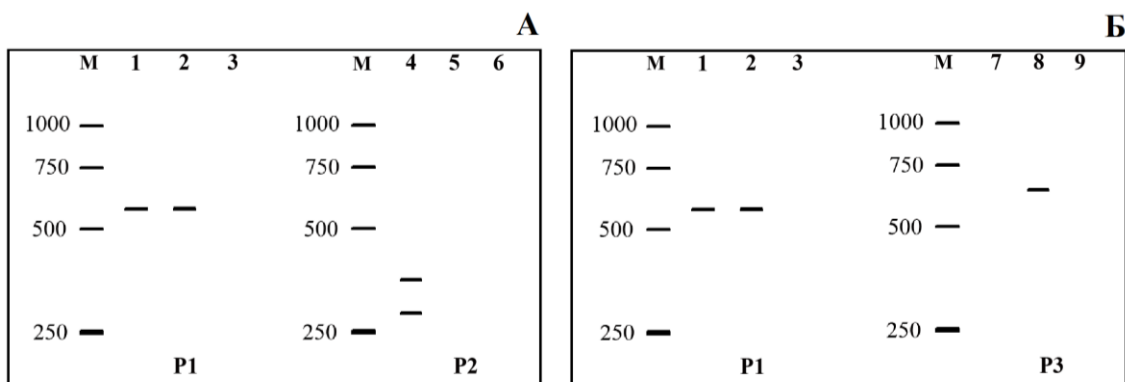
Рисунок 7. – Электрофореграмма, отражающая результаты ПЦР-ПДРФ анализа, проведенного для установления видовой принадлежности тлей *Aphis spiraecola* / *A. pomi*

В результате рестрикционного анализа из 90 образцов тлей *A. spiraecola* / *A. pomi*, коллектированных с разных кормовых растений, 65 образцов были идентифицированы как *A. pomi* и 25 – как *A. spiraecola*.

Для идентификации тлей рода *Dysaphis*, в частности, *D. plantaginea*, *D. radicola* и *D. anthrisci*, принадлежащих к числу вредителей семечковых культур, были разработаны ПЦР-ПДРФ ключи. Для оценки применимости подхода в реальных исследованиях мы провели визуализацию предполагаемых результатов рестрикции и электрофоретического разделения получаемых фрагментов методом *in silico* для данных видов тлей (рисунок 8).

Компьютерное моделирование электрофоретического разделения фрагментов позволило выяснить, что при совместном использовании эндонуклеаз AlwI и AciI, а также AlwI и MnlI можно дифференцировать тлей *D. plantaginea* / *D. radicola* / *D. anthrisci*.

Аналогичным образом были разработаны ПЦР-ПДРФ ключи для диагностики трудно дифференцируемых подвидов *A. fabae* (*A. fabae fabae* Scop., *A. fabae cirsiacanthoidis* Scop., *A. fabae mordvilkoii* и *A. fabae solanella* Theob.) и *M. cerasi* (*M. cerasi cerasi* (F.) и *M. cerasi pruniavium* Börn.).



М – маркер молекулярного веса; 1, 4, 7 – *Dysaphis plantaginea*; 2, 5, 8 – *D. radicola*; 3, 6, 9 – *D. anthrisci*; P1 – рестриктаза AlwI; P2 – рестриктаза AclI; P3 – рестриктаза MnlI

Рисунок 8. – Компьютерное моделирование электрофоретического разделения фрагментов, получаемых в результате ПЦР-ПДРФ анализа тлей рода *Dysaphis* Börn.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что метод ПЦР-ПДРФ анализа позволяет идентифицировать трудно дифференцируемые по морфологическим признакам подвиды тлей. Предложенные ПЦР-ПДРФ ключи позволяют выявлять конкретные гаплотипы у тлей *A. craccivora*, *A. gossypii* и *M. persicae*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертационного исследования

1. Бескрылые партеногенетические самки алычово-дремовой тли (*Brachycaudus divaricatae*), развивающиеся на основном растении-хозяине (*Prunus divaricata* Ldb.) в первичном (Армения) и вторичном (Беларусь) ареалах, не демонстрируют различий по дисперсии морфометрических параметров и индексов [32]. Незначительные различия, отмеченные в длине I–VIb члеников усиков и шпика последнего членика усика (среднее значение длинны ANTI варьирует от 0,08 до 0,09 мм; ANTII – от 0,08 до 0,09 мм; ANTIII – от 0,42 до 0,47 мм; ANTIV – от 0,28 до 0,34 мм; ANTV – от 0,19 до 0,24 мм; ANTVIb – от 0,08 до 0,10 мм; PT – 0,52–0,60 мм), лежат в пределах нормальных значений, характерных для вида в целом. Среди экземпляров, коллектированных в Беларуси, не отмечено особей, чьи морфометрические параметры указывали бы на наличие «эффекта основателя» или влияние иных климатических условий на морфометрию алычово-дремовой тли в Беларуси. Незначительные отклонения от средних значений морфометрических параметров в дисперсии длины III членика усика ($F=2,738$; $p=0,00$), длины IV членика усика ($F=5,830$; $p=0,000$), длины V членика усика ($F=4,439$; $p=0,00$) и длины шпика последнего членика усика ($F=5,680$; $p=0,000$) отмечены у экземпляров, коллектированных в Южном и Южно-Центральном районах интродукции древесных растений Беларуси [6, 29].

2. Между выборками *B. divaricatae* из Беларуси, где они являются инвайдерами, и аборигенными *B. divaricatae* из Армении не выявлено значимых различий по 11 микросателлитным локусам и последовательности гена COI ($p > 0,05$) [2, 15, 16, 18, 21, 30–32]. Уровень внутривидовой изменчивости микросателлитных локусов у *B. divaricatae* на территории Беларуси эквивалентен уровню изменчивости тех же локусов, выявляемому у *Macrosiphum rosae* (число аллелей варьирует от 1 до 3, генетическая дистанция – от 0,000 до 0,769), не являющихся инвайдерами на территории Беларуси [1, 9, 17, 20, 22, 23]. Экспансия *B. divaricatae* на территорию Беларуси, не сопровождающаяся существенной потерей генетической вариативности, указывает на неоднократное проникновение этого вида на территорию Беларуси и его общую стабильность в условиях вторичного ареала.

3. Уровень вариативности консервативного митохондриального гена COI у тлей разных семейств значительно различается ($p = 0,000$; $F = 206,50$). Максимальное значение взвешенной средней внутривидовой генетической дистанции характерно для тлей семейства Eriosomatidae – $0,00427 \pm 0,000325$ (показатель является средним значением, а второй – стандартной ошибкой среднего), минимальное – для Chaitophoridae – $0,000085 \pm 0,000166$. Значение внутривидовой генетической дистанции, рассчитываемой по митохондриальным генам, находится в зависимости от особенностей биологии и экологии, характерных для вида [8, 19, 37].

4. В определение уровня внутривидового генетического полиморфизма у тлей наибольший вклад вносят такие особенности экологии как широта спектра кормовых растений (ANOVA; $p = 0,000$; $F = 54,423$ между полифагами, олигофагами и монофагами) [10] и наличие аналоциклии как варианта биологического цикла (ANOVA; $p = 0,000$; $F = 729,90$ между анологичными и голоциклическими видами) [10]. Полифаги с субкосмополитным распространением, являющиеся анологичными на большей части ареала, характеризуются наибольшим уровнем внутривидового генетического полиморфизма митохондриальных генов COI и *cytb* в сравнении с монофагами и олигофагами с разной шириной ареала (ANOVA; $p = 0,000$; $F = 21,214$) и видами, для которых наличие аналоциклии не характерно (ANOVA; $p = 0,000$; $F = 179,77$) [8, 27, 37].

5. В геноме полифага (генералиста с широким спектром кормовых растений) *Aphis fabae mordvilkoii* выявлено 50 генов CYP450 4-го и 6-го семейства, отвечающих за метаболизм ксенобиотиков и, в том числе, вторичных метаболитов растений у насекомых [3, 4, 13]. При этом 31 ген принадлежит к семейству CYP4 и 19 – к семейству CYP6. Общее количество этих генов в геноме *A. fabae mordvilkoii* не превышает число копий, выявляемых в геномах олигофагов *Acyrtosiphon pisum* и *Diuraphis noxia* [26]. Гены CYP450 4-го и 6-го семейства у тлей характеризуются в целом высоким уровнем генетической вариативности. Гены, принадлежащие к 4 семейству, имеют более высокую внутривидовую и межвидовую изменчивость как нуклеотидных, так и аминокислотных последовательностей.

кислотных последовательностей в сравнении с генами 6 семейства [14, 24, 26, 35]. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей СУР4 и СУР6, проведенный методом Байесовского анализа с использованием метода Монте-Карло для Марковских цепей (МСМС) с высоким значением апостериорной вероятности топологии ветвей (от 0,75 до 1) показал, что кластеризация последовательностей на генных деревьях происходит в соответствии с принадлежностью продукта гена к конкретному семейству белков.

6. Полученные нуклеотидные последовательности генов COI и EF-1 α 18 видов тлей рецетной фауны Беларуси депонированы в Международные базы данных нуклеотидных последовательностей и могут использоваться для идентификации видов. Для 15 видов тлей нуклеотидные последовательности были получены впервые [28, 33, 34, 36, 37]. Разработаны ПЦР-ПДРФ ключи, позволяющие проводить корректную диагностику 11 трудно дифференцируемых по морфологическим признакам видов и подвидов тлей – вредителей сельскохозяйственных и декоративных культур, а также выявлять конкретные гаплотипы COI у многоядных видов тлей [5, 7, 11, 12, 25].

Рекомендации по практическому использованию результатов исследования

Полученные результаты имеют важное значение для понимания микроэволюционных процессов, происходящих на разных уровнях – от видового, до геномного – у таксона насекомых, объединяющего большое число экономически значимых вредителей сельскохозяйственных и культивируемых растений.

Полученные сведения о морфометрической изменчивости и генетической вариативности рекомендуется использовать в научных исследованиях, связанных с мониторингом численности и видового состава тлей – переносчиков вирусов и вредителей культивируемых растений, а также селекционных работ на устойчивость к этим фитофагам.

ДНК-штрихкоды, полученные для тлей фауны Беларуси, рекомендуется использовать для корректной диагностики тлей, регистрируемых на ввозимом в страну посадочном материале, а также для выявления чужеродных видов в природных экосистемах.

ПЦР-ПДРФ таблицы рекомендуются использовать специалистам в области карантина и защиты растений при идентификации трудно дифференцируемых по морфологическим признакам видов *Aphis pomi* / *Aphis spiraecola*, *Dysaphis plantaginea* / *Dysaphis radicola* / *Dysaphis anthrisci*, а также подвидов *Aphis fabae fabae* / *Aphis fabae cirsiiacanthoidis* / *Aphis fabae mordvilkoii* / *Aphis fabae solanella*) и *Myzus cerasi cerasi* / *Myzus cerasi pruniavium*.

Учебные материалы «Идентификация видов и построение филогений» успешно используются при проведении практических занятий по курсу «Генетические аспекты биотехнологии животных (акт внедрения № 0304 / 558 от 16.02.2017 г.), а также при

написании курсовых и дипломных работ, магистерских диссертаций студентами биологического факультета.

Учебные материалы «Основы статистического анализа ДНК» успешно используются при проведении практических занятий по курсу «Генетические аспекты биотехнологии животных (акт внедрения № 0304 / 559 от 16.02.2017 г.), а также при написании курсовых и дипломных работ, магистерских диссертаций студентами биологического факультета.

СПИСОК РАБОТ СОИСКАТЕЛЯ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Статьи в научных изданиях, включенных в перечни ВАК

1. **Воробьева, М.М.** Генетическая вариабельность аборигенных и инвазивных видов тлей родов *Macrosiphum* Pass. и *Brachycaudus* van der Goot / М.М. Воробьева, П.К. Супранович, Н.В. Воронова // Труды Белорусского государственного университета. Сер. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2014. – Т. 9, Ч. 2. – С. 135–142.

2. **Воробьева, М.М.** Предварительные результаты изучения уровня генетического сходства инвазивных и аборигенных популяций алычовой тли (*Brachycaudus divaricatae* Shar., 1956) / М.М. Воробьева, Н.В. Воронова, С.В. Буга // Вестник Белорусского ун-та. Сер. 2. Химия. Биология. География. – 2015. – № 3. – С. 48–53.

3. Воронова, Н.В. Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности генов и аминокислотной последовательности белков основных ферментов системы детоксикации насекомых / Н.В. Воронова, С.А. Белая, **М.М. Воробьева** / Труды Белорусского государственного университета. Сер. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2015. – Т. 10, Ч. 1. – С. 139–145.

4. **Воробьева, М.М.** Устойчивость к имидаклоприду у тлей *Aphis gossypii*, ассоциированных с разными кормовыми растениями / М.М. Воробьева, Н.В. Воронова // Вестник защиты растений. – 2016. – № 3 (89). – С. 41–43.

5. Применимость метода ПЦР-ПДРФ-анализа баркодинг-региона COI для идентификации инвазивных видов насекомых в фауне Беларуси (на примере тлей рода *Aphis* L.) / Н.В. Воронова, **М.М. Воробьева**, Д.Г. Жоров, С.В. Буга // Молекулярная и прикладная генетика : сб. научн. тр. – 2016. – Т. 21. – С. 64–70.

6. **Воробьева, М.М.** Морфометрическая гетерогенность алычово-дремовой тли (*Brachycaudus divaricatae* Shar.) в условиях Беларуси / М.М. Воробьева, Н.В. Воронова // Труды Белорусского государственного университета. Сер. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2016. – Т. 11, Ч. 2. – С. 305–313.

7. **Воробьева, М.М.** ПЦР-ПДРФ таблицы для корректной идентификации труднодифференцируемых видов тлей – вредителей семечковых культур / М.М. Воробьева, Н.В. Воронова, С.В. Буга // Труды Белорусского государственного университета. Сер. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2016. – Т. 11, ч. 2. – С. 220–225.

8. **Воробьева, М.М.** Внутривидовой полиморфизм гена COI у тлей разных эколого-систематических групп / М.М. Воробьева, Н.В. Воронова // Экологический вестник. – 2017. – № 2 (40). – С. 20–25.

Статьи в сборниках научных трудов

9. **Воробьева, М.М.** Генетическая структура вида *Macrosiphum gei* Koch, 1855 в Беларуси / М.М. Воробьева, П.К. Супранович, Н.В. Воронова // Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. науч. тр. / Національна академія наук України, Інститут молекулярної біології і генетики, Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова / редкол.: В.А. Кунах (голов. ред.) [та ін.]. – К.: Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова, 2016. – Т. 18. – С. 36–41.

10. **Воробьева, М.М.** Различия в уровне внутривидовой генетической изменчивости в таксонах тлей, отличающихся характером эволюционной динамики / М.М. Воробьева, Н.В. Воронова // Фактори експериментальної еволюції організмів : зб. науч. тр. / Національна академія наук України, Інститут молекулярної біології і генетики, Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова / редкол.: В.А. Кунах (голов. ред.) [та ін.]. – К. : Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова, 2017. – Т. 20. – С. 20–25.

11. **Воробьева, М.М.** Эффективность использования метода ПЦР-ПДРФ анализа для диагностики подвидов у тлей на примере *Aphis fabae* Scopoli, 1763 и *Myzus cerasi* (Fabricius, 1775) / М.М. Воробьева, Н.В. Воронова // Зоологические чтения – 2017 : сборник статей Международной научно-практической конференции, Гродно, 15–17 марта 2017 г. ; редкол. : О. В. Янчуревич [и др.]. – Гродно : ГрГУ, 2017. – С. 49–52.

12. **Воробьева, М.М.** Оценка применимости метода ПЦР-ПДРФ анализа для выявления гаплотипов гена COI, у многоядных видов тлей (на примере *Aphis craccivora* Koch, *Aphis gossypii* Glover, *Myzus persicae* (Sulzer)) / М.М. Воробьева, Н.В. Воронова // Итоги и перспективы развития энтомологии в Восточной Европе : сборник статей II Международной научно-практической конференции, Минск, 6–8 сентября 2017 г. ; редкол. : О.И. Бородин, В.И. Цинкевич. – Минск: А.Н. Вараксин, 2017. – С. 116–129.

13. Активность неспецифических эстераз и устойчивость к инсектицидам в лабораторных линиях тлей *Myzus persicae* (Sulzer) / Н.В. Воронова, **М.М. Воробьева**, Я.В. Ковалев, Р.С. Шулинский, А.Д. Раловец // Итоги и перспективы развития энтомологии в Восточной Европе : сборник статей II Международной научно-

практической конференции, Минск, 6–8 сентября 2017 г. ; редкол. : О.И. Бородин, В.И. Цинкевич. – Минск: А.Н. Вараксин, 2017. – С. 130–144.

14. **Воробьева, М.М.** Анализ белок-кодирующих областей генов CYP450 4-го и 6-го семейств у тлей с разным перечнем кормовых растений / М.М. Воробьева, Н.В. Воронова // Актуальные проблемы зоологической науки в Беларуси : сборник статей XI Зоологической Международной научно-практической конференции, приуроченной к десятилетию основания ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам», Беларусь, Минск, 1–3 ноября 2017 г. ; редкол. : О.И. Бородин [и др.]. – Минск : Издатель А.Н. Вараксин, 2017. – С. 104–109.

Материалы конференций

15. **Воробьева, М.М.** Генетическая вариабельность *Brachycaudus divaricatae* методом микросателлитного анализа / М.М. Воробьева, Н.В. Воронова, С.В. Буга // Зоологические чтения – 2015: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной памяти профессора Бенедикта Дыбовского, Гродно, 22–24 апреля 2015 г., ГрГУ им. Я. Купалы; под ред. О.В. Янчуревич [и др.]. – Гродно : ГрГУ, 2015. – С. 67–69.

16. **Воробьева, М.М.** Микросателлитный анализ популяций *Brachycaudus divaricatae* фауны Беларуси и Армении / М.М. Воробьева // От идеи – к инновации : материалы XXII Респ. студ. науч.-практ. конф., Мозырь, 23 апр. 2015 г. В 2 ч. Ч. 2. / УО МГПУ им. И.П. Шамякина ; редкол. : И.Н. Кралевиц (отв. ред.) [и др.]. – Мозырь, 2015. – С. 15.

17. **Воробьева, М.М.** Анализ микросателлитной изменчивости тлей рода *Macrosiphum* фауны Беларуси / М.М. Воробьева, П.К. Супранович // Материалы XVII Республиканской научно-практической конференции молодых ученых, Брест, 15 мая 2015 г. ; М-во образования Респ. Беларусь, Брест. гос. ун-т им. А.С. Пушкина ; под общ. ред. А.Е. Будько. – Брест : БрГУ, 2015. – Ч. 1. – С. 91–93.

18. **Воробьева, М.М.** Генетический анализ микросателлитных локусов у *Brachycaudus divaricatae* Shar. (Rhynchota; Aphididae): варьирование признаков в аборигенных и инвазивных популяциях тлей / М.М. Воробьева, Н.В. Воронова, С.В. Буга // Актуальные проблемы биологии, биотехнологии, экологии и биобезопасности: материалы Международной научно-практической конференции посвященной 80-летию заслуженного ученого, профессора В.Л. Зайцева, п.г.т. Гвардейский, 13 июля 2015 г. – Кордай : «Kiik-LTD», 2015. – С. 94–98.

19. **Воробьева, М.М.** Представленность нуклеотидных последовательностей тлей подтрибы Anuraphidina в генетических базах данных: обзорный анализ / М.М. Воробьева, А.В. Стеколыщиков, Н.В. Воронова // Материалы I Международной научно-практической конференции «Современные проблемы энтомологии Восточной Европы», Минск, 8–10 сентября 2015 г. ; редкол. : О.И. Бородин [и др.]. – Минск : Экоперспектива, 2015. – С. 71–75.

20. **Воробьева, М.М.** Тли фауны Беларуси: генетическая структура популяций, имеющих разную микроэволюционную историю / М.М. Воробьева, П.К. Супранович, Н.В. Воронова // Материалы I Международной научно-практической конференции «Современные проблемы энтомологии Восточной Европы», Минск, 8–10 сентября 2015 г. ; редкол. : О.И. Бородин [и др.]. – Минск : Экоперспектива, 2015. – С. 75–79.

21. **Воробьева, М.М.** Алычовая тля (*Brachycaudus divaticatae* (Shaposhnikov, 1956)) в Беларуси : современное распространение вида и вариабельность STR-локусов генома / М.М. Воробьева, Д.Г. Жоров, Н.В. Воронова // Проблемы сохранения биологического разнообразия биологического разнообразия и использования биологических ресурсов : материалы III Международной конференции, посвященной 110-летию со дня рождения академика Н.В. Смольского, Минск, 7–9 октября 2015 г. ; редкол. : В.В. Титок [и др.]. – Минск : Конфидо, 2015. – Ч. 2. – С. 80–85.

22. **Воробьева, М.М.** Генетическая структура популяций аборигенных и инвазивных видов тлей фауны Беларуси / М.М. Воробьева, Н.В. Воронова // Материалы II Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века : проблемы, достижения, перспективы», Минск, 13–16 октября 2015 г. ; редкол. : А.В. Кильчевский [и др.]. – Минск : Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси, 2015. – С. 150.

23. **Воробьева, М.М.** Результаты изучения уровня внутривидовой вариабельности тлей *Macrosiphum rosae* Linnaeus, 1758 / М.М. Воробьева, П.К. Супранович // Молодежь в науке – 2015 : материалы XII Международной научной конференции молодых ученых, Минск, 1–4 декабря 2015 г. ; редкол. : С.А. Усанов [и др.]. – Минск : Национальная Академия Наук Беларуси, 2015. – С. 54.

24. Предварительные результаты клонирования гена CYP6A13 тлей *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) / **М.М. Воробьева**, Д.В. Галиновский, С.А. Белая, Н.В. Воронова // Эколого-биологические аспекты состояния и развития Полесского региона : материалы VII Междунар. заочн. науч.-практ. конф. «Современные экологические проблемы развития Полесского региона и сопредельных территорий: наука, образование, культура», Мозырь, 28 октября 2016 г. ; УО МГПУ им. И.П. Шамякина ; редкол. : О.П. Позывайло [и др.] ; под общ. ред. д-ра биол. наук, проф. В.В. Валетов. – Мозырь, 2016. – С. 114–117.

25. **Воробьева, М.М.** Молекулярно-видовая диагностика инвазивных видов тлей *Aphis pomi* Deg., 1773 и *Aphis spiraecola* Patch, 1914 / М.М. Воробьева, О.А. Беляк // Молодежь в науке – 2016 : материалы XIII Международной научной конференции молодых ученых, Минск, 22–25 ноября 2016 г.) ; редкол. : С.А. Усанов [и др.]. – Минск : Национальная Академия Наук Беларуси, 2016. – С. 118.

26. Генетическая вариабельность у тлей: связь гостальной пластичности и изменчивости наиболее консервативных участков митохондриального генома / **М.М. Воробьева**, Д.И. Лавриеня, Н.В. Воронова, С.В. Буга // Материалы III Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века : проблемы, достижения, перспективы», посвященная 115-летию со дня рождения академика А.Р. Жебрака», Минск, 23–25 ноября 2016 г. ; редкол. : А.В. Кильчевский [и др.]. – Минск : Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси, 2016. – С. 18.

27. Математическое моделирование скорости накопления нуклеотидных замен в эволюционно консервативных генах / Н.В. Воронова, Ю.В. Бондаренко, **М.М. Воробьева**, П.Ю. Кветко, А.В. Кривая // Материалы III Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века : проблемы, достижения, перспективы», посвященная 115-летию со дня рождения академика А.Р. Жебрака», Минск, 23–25 ноября 2016 г. ; редкол. : А.В. Кильчевский [и др.]. – Минск : Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси, 2016. – С. 19.

28. **Воробьева, М.М.** ДНК-штрихкодирование рецентных видов тлей фауны Беларуси / М.М. Воробьева, Н.В. Воронова, С.В. Буга // Молекулярно-генетические и биотехнологические основы получения и применения синтетических и природных биологически активных веществ (Нарочанские чтения – 11) : материалы Международной научно-практической конференции, Минск – Ставрополь, 20–23 сентября 2017 г. – Минск – Ставрополь : Белорусский государственный университет, Северо-Кавказский федеральный государственный университет, 2017. – С. 23–30.

29. **Воробьева, М.М.** Морфометрическая характеристика бескрылых партеногенетических самок алычовой тли (*Brachycaudus divaricatae* Shap.) по материалам, собранным на территории Беларуси / М.М. Воробьева // XI Машеровские чтения: материалы Международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных, Витебск, 18 октября 2017 г. ; редкол.: И.М. Прищепя (гл. ред.) [и др.]. – Витебск : ВГУ имени П.М. Машерова, 2017. – С. 55–57.

Тезисы докладов

30. **Воробьева, М.М.** Сравнительный анализ микросателлитной изменчивости в аборигенных и инвазивных популяциях тли *Brachycaudus divaricatae* / М.М. Воробьева // Ломоносов–2015 : тезисы докладов XXII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых : Секция «Биология» ; 13–17 апреля 2015 г., МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет ; сост. И.А. Екимова. – М. : МАКС Пресс, 2015. – С. 146–147.

31. Voronova, N. *Brachycaudus divaricatae* Shap. (Sternorrhyncha, Aphididae) in Belarus: genetic divergence from Armenian aboriginal forms / N. Voronova, **M. Varabyova**, S. Buga // NEOBIOTA 2016. Biological Invasions : Interactions with Environmental Change : book of abstracts 9th International Conference on Biological Inva-

sions; Vianden, Luxembourg, 14–16 September 2016. – Fondation faune-flore, Luxembourg, 2016. – P. 182.

32. **Воробьева, М.М.** Полиморфизм значений морфометрических и генетических характеристик алычовой тли (*Brachycaudus divaricatae* Shar.) фауны Беларуси / М.М. Воробьева // Биологическая осень 2017 : к Году науки в Беларуси : тезисы докладов Международной научно-практической конференции молодых ученых, Беларусь, Минск, 9 ноября 2017 г. ; БГУ, Биологический факультет, Совет молодых ученых ; редкол. : В.В. Лысак (гл. ред.) [и др.]. – Минск : БГУ, 2017. – С. 247–248.

33. Корбут А.В. Анализ последовательности гена EF1 α тлей фауны Беларуси / А.В. Корбут, **М.М. Воробьева** // Биологическая осень 2017 : к Году науки в Беларуси : тезисы докладов Международной научно-практической конференции молодых ученых, Беларусь, Минск, 9 ноября 2017 г. ; БГУ, Биологический факультет, Совет молодых ученых ; редкол. : В.В. Лысак (гл. ред.) [и др.]. – Минск : БГУ, 2017. – С. 253–254.

34. Левыкина, С.С. ДНК-штрихкодирование и построение филогенетических деревьев на основе последовательностей COI некоторых видов тлей фауны Беларуси / С.С. Левыкина, **М.М. Воробьева** // Биологическая осень 2017 : к Году науки в Беларуси : тезисы докладов Международной научно-практической конференции молодых ученых, Беларусь, Минск, 9 ноября 2017 г. ; БГУ, Биологический факультет, Совет молодых ученых ; редкол. : В.В. Лысак (гл. ред.) [и др.]. – Минск : БГУ, 2017. – С. 262–263.

35. **Воробьева, М.М.** Изменчивость генов CYP450 4 и 6 семейств у модельного вида тлей *Muzus persicae* (Sulzer, 1776) / М.М. Воробьева, Д.В. Галиновский, Н.В. Воронова // Международный симпозиум по геномике, приуроченный к году науке в Республики Беларусь : тезисы докладов, Минск, 21–23 ноября 2017 г. ; Институт генетики и цитологии НАН Беларуси [и др.]. – Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 2017. – С. 41.

Учебно-методические издания

36. Воронова, Н.В. Идентификация видов и построение филогений : учебные материалы / Н.В. Воронова, **М.М. Воробьева**. – Минск: БГУ, 2015. – 15 с.

37. Воронова, Н.В. Основы статистического анализа ДНК : учебные материалы / Н.В. Воронова, **М.М. Воробьева**. – Минск: БГУ, 2015. – 17 с.

РЭЗІЮМЭ

Вараб'ёва Марыя Міхайлаўна

МАРФАЛАГІЧНАЯ ЗМЕНЛІВАСЦЬ І ГЕНЕТЫЧНАЯ ВАРЫЯБЕЛЬНАСЦЬ ВІДАЎ ТЛЕЙ (STERNORRHYNCHA: APHIDOIDEA), ЯКІЯ АДНОСЯЦА ДА РОЗНЫХ ЭКОЛАГА-СІСТЭМАТЫЧНЫХ ГРУП

Ключавыя словы: морфаметрычныя характарыстыкі, генетычная варыябельнасць, шырыня арэала, спектр кармавых раслін, біялагічны цыкл, інвазіўны від, абарыгенны від, ДНК-штрыхкадаванне, ПЛР-ПДРФ ключы, тлі, фаўна Беларусі.

Мэта даследавання: ацэнка ўзроўню марфалагічнай і генетычнай зменлівасці тлей як таксонаў, што ўключаюць віды, якія адрозніваюцца паміж сабой асаблівасцямі біялогіі і экалогіі, а таксама атрыманне ДНК-штрыхкодаў і распрацоўка ПЛР-ПДРФ ключоў для дыягностыкі некаторых відаў тлей фаўны Беларусі.

Метады даследавання: агульнапрынятыя энтамалагічныя, морфаметрычныя, параўнальна-экалагічныя і малекулярна-генетычныя.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: атрыманы арыгінальныя дадзеныя, якія характарызуюць узровень морфаметрычнай гетэрагеннасці інвазіўнага на тэрыторыі Беларусі віду тлей *Brachycaudus divaricatae* Shar. Праведзены параўнальны аналіз морфаметрычнай зменлівасці і генетычнай варыябельнасці інвазіўных і неінвазіўных відаў тлей (на аснове выбарак бяскрылых партэнагенетычных самак з першаснага і другаснага арэалаў). Дэпанаваны ў Рэспубліканскі Банк ДНК чалавека, жывёл, раслін і мікраарганізмаў 26 узораў біялагічнага матэрыялу і 26 узораў ДНК тлей – шкоднікаў сельскагаспадарчых і іншых культур, якія апрацоўваюцца. Расшыфраваны і дэпанаваны ў GenBank нуклеатыдныя паслядоўнасці генаў COI і EF-1 α для 18 відаў тлей рэцэнтнай фаўны Беларусі, сярод якіх для 15 відаў тлей нуклеатыдныя паслядоўнасці былі атрыманы ўпершыню. Упершыню ўстаноўлена колькасць і вывучаны ўзровень варыябельнасці адаптыўна значных генаў (CYP450 4-га і 6-га сямейства) у тлей *Aphis fabae mordvilkoii* Börn. & Janisch. Упершыню распрацаваны ПЛР-ПДРФ ключы, якія дазваляюць праводзіць карэктную дыягностыку цяжкадыферэнцыруемых па марфалагічных прыкметах відаў тлей роду *Dysaphis* Börn., падвідаў *Aphis fabae* Scop. і *Myzus cerasi* F., а таксама выяўляць пэўныя гаплатыпы COI ў некаторых многоядных відаў тлей.

Вобласць прымянення: энтамалогія, экалогія і ахова прыроды, сельская гаспадарка, ахова і каранцін раслін, малекулярная генетыка, адукацыя і экалагічная асвета.

РЕЗЮМЕ

Воробьева Мария Михайловна

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ВИДОВ ТЛЕЙ (STERNORRHYNCHA: ARHIDOIDEA), ОТНОСЯЩИХСЯ К РАЗНЫМ ЭКОЛОГО-СИСТЕМАТИЧЕСКИМ ГРУППАМ

Ключевые слова: морфометрические характеристики, генетическая вариабельность, широта ареала, спектр кормовых растений, биологический цикл, инвазивный вид, аборигенный вид, ДНК-штрихкодирование, ПЦР-ПДРФ ключи, тли, фауна Беларуси.

Цель исследования: оценка уровня морфологической и генетической изменчивости тлей как таксона, включающего виды, различающиеся между собой особенностями биологии и экологии, а также получение ДНК-штрихкодов и разработка ПЦР-ПДРФ ключей для диагностики некоторых видов тлей фауны Беларуси.

Методы исследования: общепринятые энтомологические, морфометрические, сравнительно-экологические и молекулярно-генетические.

Полученные результаты и их новизна: Получены оригинальные данные, характеризующие уровень морфометрической гетерогенности инвазивного на территории Беларуси вида тлей *Brachycaudus divaricatae* Shar. Проведен сравнительный анализ морфометрической изменчивости и генетической вариабельности инвазивных и неинвазивных видов тлей (на основе выборок бескрылых партеногенетических самок, коллектированных из первичного и вторичного ареалов). Депонированы в Республиканский Банк ДНК человека, животных, растений и микроорганизмов 26 образцов биологического материала и 26 образцов ДНК тлей – вредителей сельскохозяйственных и иных возделываемых культур. Расшифрованы и депонированы в GenBank нуклеотидные последовательности генов COI и EF-1 α для 18 видов тлей рецентной фауны Беларуси, среди которых для 15 видов тлей нуклеотидные последовательности были получены впервые. Впервые установлено количество и изучен уровень вариабельности адаптивно значимых генов (СУР450 4-го и 6-го семейства) у тлей *Aphis fabae mordvilkoii* Böm. & Janisch. Впервые разработаны ПЦР-ПДРФ ключи, позволяющие проводить корректную диагностику труднодифференцируемых по морфологическим признакам видов тлей рода *Dysaphis* Böm., подвидов *Aphis fabae* Scop. и *Myzus cerasi* F., а также выявлять конкретные гаплотипы COI у некоторых многоядных видов тлей.

Область применения: энтомология, экология и охрана природы, сельское хозяйство, защита и карантин растений, молекулярная генетика, образование и экологическое просвещение.

SUMMARY

Maryia M. Varabyova

MORPHOLOGICAL AND GENETIC VARIABILITY OF APHID SPECIES (STERNORRHYNCHA: APHIDOIDEA) FROM DIFFERENT ECOLOGICAL AND TAXONOMY GROUPS

Key words: morphometric characters, genetic variability, distribution, host plants list, biological cycle, invasive species, aboriginal species, DNA-barcoding, PCR-RFLP identification, aphids, fauna of Belarus.

The aims of the work the following: evaluation of levels of morphological and genetic variability of aphids as a taxon including species with varied biological and ecological features, as well as obtaining DNA-barcodes and development of PCR-RFLP keys for diagnostics of several aphid species of fauna of Belarus.

Methods of research: entomological, morphometric, comparative ecological and molecular genetic methods.

Obtained results and their novelty: Original data was obtained to characterize the level of morphometric heterogeneity of invasive aphid species *Brachycaudus divaricatae* Shap. on the territory of Belarus. Comparative analysis of morphometric and genetic variability of invasive and non-invasive species was conducted based on samples of apterous parthenogenic females from primary and secondary areal. 26 biological samples and DNA samples of pest aphids were deposited in Republican bank of human, animals, plant and microorganisms. Nucleotide sequences of COI and EF-1 α genes of 18 aphid species of current Belarus fauna were sequenced and deposited in GenBank, sequences for 15 aphid species were obtained for the first time. Number and variability level of key adaptive genes (CYP450 of 4 and 6 families) of aphid *Aphis fabae mordvilkoii* Börn. & Janisch were determined for the first time. PCR-RFLP keys enabling correct diagnostics of difficultly distinguishable via morphological characters aphid species of genus *Dysaphis* Börn., subspecies of *Aphis fabae* Scop. and *Myzus cerasi* F. as well as detecting certain COI haplotypes of several polyphagous aphid species were developed for the first time.

Field of application: entomology, ecology and nature conservancy, agriculture, plant protection and quarantine, molecular genetics, higher education and ecological education.